

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 641**

51 Int. Cl.:

| | |
|--------------------|-----------|
| A61K 35/74 | (2015.01) |
| C12N 1/20 | (2006.01) |
| A61P 31/00 | (2006.01) |
| A23C 9/123 | (2006.01) |
| C12R 1/225 | (2006.01) |
| A23L 33/135 | (2006.01) |
| A23L 7/104 | (2006.01) |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.05.2014 PCT/US2014/037517**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **13.11.2014 WO14183050**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2014 E 14795405 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019 EP 2994150**

54 Título: **Probióticos y métodos de uso**

30 Prioridad:

10.05.2013 US 201361821990 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.11.2019

73 Titular/es:

**H.J. HEINZ COMPANY BRANDS LLC (100.0%)
One PPG Place
Pittsburgh, PA 15222, US**

72 Inventor/es:

**FASANO, FRANCESCA, ROMANA y
RESCIGNO, MARIA**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 729 641 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Probióticos y métodos de uso

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones para su uso en la administración a gestantes y lactantes. El uso es útil para el tratamiento de infección en la descendencia de dichos sujetos.

10 Antecedentes de la invención

A pesar de los avances clínicos modernos, las infecciones siguen causando morbilidad y mortalidad significativa en neonatos, especialmente en neonatos pretérmino pequeños. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, las infecciones, incluyendo síndrome séptico, neumonía, tétanos y diarrea, representan aproximadamente un 36 % de los 3,3 millones de muertes de neonatos en todo el mundo al año. El sistema inmunitario de los neonatos es funcionalmente inmaduro. El diagnóstico de infecciones en el neonato puede ser difícil porque los síntomas pueden ser sutiles y no específicos. Aunque muchas infecciones responden bien a antibióticos, el retardo en los tratamientos con antibiótico puede dar lugar a una rápida progresión de las infecciones y al desarrollo de afecciones muy graves tales como septicemia en neonatos. La septicemia en neonatos sin tratar es invariablemente mortal. Las tasas de mortalidad por septicemia en lactantes tratados con antibióticos varían entre un 5 % y un 60 % con las tasas más altas presentadas por los países de ingresos más bajos. Hay una necesidad continuada de nuevas estrategias y agentes para el tratamiento y prevención de infecciones en lactantes.

El documento WO 2012/177556 A2 se refiere a un método de tratamiento de un sujeto en riesgo de desarrollar un trastorno gastrointestinal, comprendiendo el método: a) identificar un sujeto en riesgo de un trastorno gastrointestinal; b) administrar una cantidad eficaz de una composición que comprende un producto alimenticio, en el que el producto alimentación se ha fermentado por la bacteria probiótica *Lactobacillus paracasei* CBA L74.

El documento WO 2011/039328 A1 se refiere a una composición que comprende *Bifidobacterium breve* a administrar a madres durante la gestación y/o periodo de lactancia y/o a lactantes para su uso en la prevención de trastornos inflamatorios del lactante que se producen al menos dos meses después en su vida.

El documento EP 1565547 B1 se refiere a una cepa de bacterias, un cultivo, una composición o producto para tratamiento terapéutico o profiláctico. El mismo puede administrarse a mujeres en periodo de lactancia para el tratamiento de sus lactantes amamantados.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un producto alimenticio fermentado para su uso en el tratamiento de una infección microbiana en el lactante de una gestante o madre en periodo de lactancia. Una cantidad eficaz del producto alimenticio fermentado se administra a la madre. El producto alimenticio se ha fermentado por la bacteria probiótica *Lactobacillus paracasei* CBA L74, n.º de acceso al Depósito Internacional LMG P-24778. El producto alimenticio comprende *Lactobacillus paracasei* CBA L74 no replicante. El producto alimenticio fermentado puede administrarse de forma prenatal, posnatal o prenatal y posnatal hasta que se desteta al lactante. El microbio puede ser *Salmonella typhimurium*, *Cronobacter sakazakii*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pneumoniae* *Neisseria meningitidis* o un rotavirus. El producto alimenticio fermentado puede ser un producto lácteo o de cereal. También se proporciona una composición farmacéutica que comprende uno o más metabolitos productos por *L. paracasei* CBA L74, n.º de acceso al Depósito Internacional LMG P-24778, en combinación con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables para su uso en el tratamiento de una infección microbiana en el lactante de una gestante o madre en periodo de lactancia. Una cantidad eficaz de la composición se administra a la madre.

Breve descripción de los dibujos

Estas y otras características y ventajas de la presente invención se divulgarán más completamente en, o serán obvias por, la siguiente descripción detallada de la realización preferida de la invención, que debe considerarse junto con los dibujos adjuntos en los que números similares se refieren a partes similares y, además, en los que:

La figura 1 es un gráfico que representa los resultados de un análisis del efecto de la administración materna de arroz fermentado con *L. paracasei*, cepa CBA L74 en la supervivencia de descendencia infectada por *Cronobacter sakazakii*.

La figura 2 es un gráfico que representa los resultados de un análisis del efecto de la administración maternal de arroz fermentado con *L. paracasei*, cepa CBA L74 en la supervivencia de descendencia infectada por *Cronobacter sakazakii*.

65

La figura 3 es un gráfico que representa los resultados de un análisis del efecto de la administración materna de leche fermentada con *L. paracasei* CBA L74 en la supervivencia de descendencia infectada por *Salmonella typhimurium* FB62.

5 Descripción detallada de la realización preferida

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de los autores de la invención de que la administración de alimento fermentado por el organismo probiótico *Lactobacillus paracasei*, cepa CBA L74, a animales gestantes y en periodo de lactancia puede reducir o atenuar la gravedad de infecciones microbianas en su descendencia. Más específicamente, los autores de la invención han descubierto que la administración de arroz fermentado por *L. paracasei*, cepa CBA L74 a gestantes y madres en periodo de lactancia provocaba un porcentaje aumentado de supervivencia en sus crías después de infección con *Cronobacter sakazakii*. Asimismo, los autores de la invención también descubrieron que la administración de leche fermentada por *L. paracasei*, cepa CBA L74 a gestantes y madres en periodo de lactancia produjo un porcentaje aumentado de supervivencia en sus crías después de infección con *Salmonella typhimurium* FB62. Por consiguiente, la invención incluye un producto alimenticio fermentado para su uso en el tratamiento de infecciones microbianas en organismos neonatos, donde los productos alimenticios se han fermentado por *L. paracasei*, cepa CBA L74 y donde son para su administración a la madre. Las composiciones pueden administrarse a la madre durante la gestación del lactante, es decir, de forma prenatal. Como alternativa o adicionalmente, las composiciones pueden administrarse a la madre después de que haya nacido el lactante, es decir, de forma posnatal. En el producto alimenticio fermentado para su administración, la *L. paracasei*, cepa CBA L74 es no replicante.

Lactobacillus paracasei, cepa CBA L74 se aisló por los autores de la invención y se depositó según el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos con fines de procedimiento de patente el 9 de septiembre de 2008 en las Colecciones Coordinadas Belgas de Microorganismos (BCCM) Laboratorium voor Microbiologie (LMG), Ghent, Bélgica. El número de acceso dado por la autoridad de Depósito Internacional es LMG P-24778. Para facilidad la lectura, no se repetirá la expresión "número de acceso LMG P-24778" en cada ocasión. Debe entenderse que cuando se haga referencia a *L. paracasei*, cepa CBA L74, se hace referencia a la cepa depositada que tiene el número de acceso LMG P-24778.

Aunque se cree que se entienden determinados eventos que se producen tras la administración de composiciones que comprenden o están hechas por fermentación con *L. paracasei* CBA L74, las composiciones de la presente invención no están limitadas a aquellas que funcionan afectando a cualquiera mecanismo celular particular.

35 Composiciones

L. paracasei CBA L74

Las composiciones de la invención pueden incluir el organismo probiótico *L. paracasei* CBA L74. La Organización Mundial de la Salud ha definido los probióticos como: "Microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio saludable al hospedador". En algunas realizaciones, la *L. paracasei* CBA L74 puede someterse a tratamientos para hacerla no replicante, por ejemplo, exposición al calor, radiación y o radiación UV. Una *L. paracasei* CBA L74 no replicante puede ser una célula muerta o una célula viva que se ha vuelto incapaz de división celular. Una *L. paracasei* CBA L74 no replicante puede ser una célula intacta o una célula que ha experimentado lisis parcial o completa. En algunas realizaciones, las células no replicantes pueden incluir una mezcla de células intactas y lisadas.

Productos alimenticios

Las composiciones de la invención pueden incluir un vehículo fisiológicamente aceptable. El vehículo fisiológico puede ser un producto alimenticio o un vehículo farmacéutico. Se usan las expresiones "fisiológicamente aceptable" (o "farmacológicamente aceptable") para hacer referencia a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra indeseada cuando se administra a un animal o un ser humano, según lo apropiado. Por tanto, las composiciones de la invención pueden incluir productos alimenticios fermentados por el organismo probiótico *L. paracasei* CBA L74. El producto alimenticio incluye células de *L. paracasei* CBA L74, no replicantes. En algunas realizaciones, el producto alimenticio puede procesarse para eliminar todas o sustancialmente todas las células de *L. paracasei* CBA L74. Puede usarse cualquier producto alimenticio susceptible a fermentación por *L. paracasei* CBA L74. El producto alimenticio puede ser un producto lácteo, por ejemplo, leche o un producto basado en la leche. Las fuentes de leche ejemplares incluyen, sin limitación, ganado bovino, ovejas, cabras, yaks, búfalo de agua, caballos, burros, renos y camellos. Independientemente de la fuente, la leche o productos de leche pueden estar en cualquier forma adecuada para su fermentación por *L. paracasei* CBA L74. Por ejemplo, la leche puede ser leche completa o leche que se ha procesado para eliminar algo o toda la grasa láctea, por ejemplo, leche al 2 %, leche al 1 % o leche descremada. Como alternativa o adicionalmente, la leche puede pasteurizarse previamente y/u homogeneizarse, secarse y reconstituirse, condensarse o evaporarse. También pueden usarse fracciones de productos de la leche incluyen caseína, proteína de lactosuero o lactosa. En algunas realizaciones, el producto de leche puede ser leche en polvo desnatada reconstituida a aproximadamente un 1 %,

hasta aproximadamente un 30 %, por ejemplo, leche en polvo desnatada reconstituida a aproximadamente un 2 %, aproximadamente un 5 %, aproximadamente un 7 %, aproximadamente un 9 %, aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 12 %, aproximadamente un 15 %, aproximadamente un 20 %, aproximadamente un 25 %, aproximadamente un 30 %. Antes de la fermentación, el producto de leche puede combinarse con uno o más de los siguientes: a) un carbohidrato (por ejemplo, un disacárido tal como dextros o un almidón; b) un lípido; c) una vitamina y d) un mineral. Por ejemplo, la leche en polvo desnatada puede combinarse con dextrosa a aproximadamente un 2 %, por ejemplo, aproximadamente un 0,25 %, aproximadamente un 0,50 %, aproximadamente un 0,75 %, aproximadamente un 1,0 %, aproximadamente un 1,5 % o aproximadamente un 2,0 %,

El producto alimenticio puede ser un producto de cereal, por ejemplo, arroz, avena, maíz, sorgo o mijo. En algunas realizaciones, el producto de cereal puede ser trigo, cebada, centeno o triticale. El producto de cereal puede ser un grano completo o estar molido en una harina. El producto alimenticio puede ser un único tipo de cereal o una mezcla de dos o más tipos de cereales, por ejemplo, harina de avena más harina de arroz. Los productos de cereal pueden ser de una calidad y tipo adecuados para consumo humano o pueden ser productos adecuados para consumo por animales domésticos. En general el producto de cereal se hidrata antes de la fermentación. La concentración del cereal puede variar, pero los intervalos útiles incluyen de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 50 % en peso/volumen, por ejemplo, aproximadamente un 8 % en peso/volumen, aproximadamente un 10 % en peso/volumen, aproximadamente un 12 % en peso/volumen, aproximadamente un 15 % en peso/volumen, aproximadamente un 18 % en peso/volumen, aproximadamente un 20 % en peso/volumen, aproximadamente un 22 % en peso/volumen, aproximadamente un 25 % en peso/volumen, aproximadamente un 30 % en peso/volumen, aproximadamente un 35 % en peso/volumen, aproximadamente un 40 % en peso/volumen, aproximadamente un 45 % en peso/volumen o aproximadamente un 50 % en peso/volumen. Las concentraciones ejemplares incluyen un 15 % en peso/volumen de arroz o una mezcla de 18,5 % en peso/volumen de harina de avena más un 5 % en peso/volumen de harina de cebada malteada. El pH de los cereales hidratados puede ajustarse usando cualquier ácido adecuado para consumo. El ácido puede ser, por ejemplo, un ácido orgánico. Los ácidos orgánicos útiles incluyen ácido acético, ácido cítrico, ácido láctico, ácido adípico, ácido málico y ácido tartárico. Puede usarse cualquier combinación de dos o más ácidos. En algunas realizaciones, el pH puede ajustarse a aproximadamente 4,0 usando ácido cítrico.

El producto alimenticio también puede ser un producto de hortalizas o uno de frutas, por ejemplo, un zumo, un puré un concentrado, una pasta, una salsa, un encurtido o un ketchup. Las hortalizas y frutas ejemplares incluyen, sin limitación, zapallos, por ejemplo, calabacín, calabaza amarilla, calabaza de invierno, calabaza; patatas, espárragos, brécol, coles de Bruselas, judías, por ejemplo., judías verdes, frijolillos, judías de Lima, habas, judías de soja, col, zanahorias, coliflor, pepinos, colirrábanos, puerros, cebolletas, cebollas, arvejas, guisantes ingleses, pimientos, nabos, colinabos, tomates, manzanas, peras, melocotones, ciruelas, fresas, frambuesas, moras, arándanos, arándanos rojos, bayas de Boysen, grosellas, uvas, grosellas, naranjas, limones, pomelos, plátanos, mangos, kiwis y carambola.

El producto alimenticio también puede ser una "leche" hecha de frutos secos o legumbres, por ejemplo, leche de soja o leche de almendra.

También se contemplan productos alimenticios que comprenden proteínas animales, por ejemplo, carne, por ejemplo, salchichas, carnes secas, pescado y productos de pescado seco.

Independiente del tipo de producto alimenticio que se use, el producto se combina con *L. paracasei* CBA L74 y se incuba a una temperatura y durante un tiempo suficientes para que se produzca la fermentación. Puede usarse cualquier método convencional de fermentación conocido en la técnica. Las condiciones específicas de fermentación variarán de acuerdo con muchos factores incluyendo, por ejemplo, el tipo de producto alimenticio, la concentración de producto alimenticio, los instrumentos que se usen, el volumen de muestra, la concentración inicial del inóculo de *L. paracasei* CBA L74, la presencia, si la hay, de un coínoculo, las propiedades organolépticas del alimento fermentado y el uso pretendido del alimento fermentado.

Tanto los instrumentos como el sustrato (es decir, el producto alimenticio a fermentar) se esterilizan antes de la inoculación con *L. paracasei* CBA L74 para disminuir el nivel de, o eliminar, las bacterias viables y/u hongos y/o virus infecciosos. Los instrumentos pueden esterilizarse usando métodos convencionales o de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La elección de un método particular para la esterilización del sustrato dependerá, en parte, de la estabilidad del sustrato al método de esterilización. Por ejemplo, el sustrato puede esterilizarse por vapor y presión, por ejemplo, por autoclave, ciclos repetidos de calentamiento y refrigeración (por ejemplo, tindalización), exposición a altas presiones (por ejemplo, pascalización), ultrafiltración o radiación (por ejemplo, exposición a rayos gamma, X, e y/o ultravioleta (longitud de onda de 10 nm a 320 nm, por ejemplo, de 50 nm a 320 nm, de 100 nm a 320 nm, de 150 nm a 320 nm, de 180 nm a 320 nm o de 200 nm a 300 nm). Las alícuotas del sustrato pueden retirarse después del tratamiento y sembrarse en medio adecuado para confirmar la ausencia de contaminantes bacterianos y/o fúngicos. Si el sustrato se ha esterilizado por exposición a altas temperaturas, debe enfriarse hasta al menos 37 °C antes de la inoculación con *L. paracasei* CBA L74.

El sustrato puede inocularse con *L. paracasei* CBA L74 de acuerdo con métodos convencionales, por ejemplo, a partir de cultivo líquido fresco o un cultivo liofilizado que se ha resuspendido en medio acuoso durante un tiempo corto antes de la inoculación. En general, *L. paracasei* CBA L74 se añade a concentraciones de aproximadamente $0,5 \times 10^6$ a aproximadamente 1×10^6 ufc/ml de sustrato, por ejemplo, de aproximadamente 1×10^6 ufc/ml, de aproximadamente 2×10^6 ufc/ml, de aproximadamente 5×10^6 ufc/ml, 7×10^6 ufc/ml, 8×10^6 ufc/ml. El cultivo debe agitarse suficientemente para producir una distribución relativamente uniforme de bacterias y sustrato, pero no excesivamente ya que *L. paracasei* CBA L74 es una bacteria anaerobia. Por ejemplo, puede agitarse un cultivo de cinco litros a aproximadamente 150 r.p.m. La temperatura de fermentación en general es a 37 °C. Pueden controlarse diversos parámetros, por ejemplo, el pH, la presión parcial de O₂, la velocidad del agitador, la temperatura, la mezcla de gases, el nivel de espuma y la concentración de sustrato durante la fermentación y ajustarse en consecuencia. El crecimiento de *L. paracasei* CBA L74 puede controlarse usando métodos microbiológicos convencionales. La fermentación se realiza hasta que la concentración de *L. paracasei* CBA L74 es aproximadamente entre aproximadamente 108 ml y aproximadamente 109 ml. Dependiendo del sustrato y otras condiciones, esta concentración puede alcanzarse en aproximadamente 10 a aproximadamente 30 horas después de la inoculación, por ejemplo, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 15 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 30 horas.

Las muestras del sustrato pueden ensayarse antes, durante y después de la fermentación para asegurar la calidad usando métodos microbiológicos convencionales. Los métodos ejemplares incluyen, aunque sin limitación, crecimiento en agar de Rogosa para *L. paracasei* CBA L74, crecimiento en agar de recuento placas (PCA) para aerobios totales, crecimiento en agar de McConkey para coliformes, crecimiento en agar para clostridios reforzado (RCM) para *Clostridia*. Además de los recuentos de colonias, pueden observarse las morfologías de las colonias y compararse con muestras de referencia.

En algunas realizaciones, puede añadirse un coinóculo junto con *L. paracasei* CBA L74 para ayudar a iniciar la fermentación. Los coinóculos útiles para la fermentación de productos de leche incluyen, por ejemplo, sin limitación, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus delbrueckii*, subesp. *Bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis*, o *Leuconostoc mesenteroides*. En general, la concentración del coinóculo será menor que la de *L. paracasei* CBA L74, por ejemplo, aproximadamente 1×10^4 /ml a 10^5 /ml. La concentración final de *S. thermophilus* puede variar de aproximadamente $0,5 \times 10^8$ /ml a aproximadamente $2,5 \times 10^8$ /ml.

Una vez que se han alcanzado las concentraciones adecuadas de *L. paracasei* CBA L74, el alimento fermentado puede procesarse adicionalmente para su uso en algunas realizaciones, el alimento fermentado puede fraccionarse para eliminar todas o sustancialmente todas las células de *L. paracasei* CBA L74. En algunas realizaciones, el pH del alimento fermentado puede ajustarse, por ejemplo, de aproximadamente 3,0 a casi neutralidad, por ejemplo, 6,5, con la adición de NaOH o KOH. En algunas realizaciones, el alimento fermentado puede secarse. El producto alimenticio fermentado puede secarse por cualquier método conocido en la técnica que provoque la retención de propiedades inmunomoduladoras del alimento fermentado. Los métodos de secado ejemplares incluyen secado por pulverización, secado por congelación, por ejemplo, liofilización o secado en tambor. El contenido final de agua del producto alimenticio fermentado puede variar, pero puede estar entre aproximadamente un 1 % y aproximadamente un 10 % o más. En algunas realizaciones, el proceso de secado puede hacer que *L. paracasei* CBA L74 sea no replicante.

Los alimentos fermentados secados pueden hidratarse antes de su uso. Dependiendo de la cantidad de líquido usado en la hidratación, los productos alimenticios fermentados pueden contener el equivalente de aproximadamente 10^2 y 10^{12} ufc/ml de *L. paracasei* CBA L74. La *L. paracasei* CBA L74 secada no forma colonias, de modo que se entiende que esta cantidad se calcula basándose en el número de bacterias vivas que estaban presentes en los alimentos fermentados antes de la etapa de secado. En algunas realizaciones, los productos alimenticios fermentados pueden incluir el equivalente de aproximadamente 10^7 a aproximadamente 10^{12} ufc/g, por ejemplo aproximadamente 5×10^7 ufc/g, aproximadamente 1×10^8 ufc/g, aproximadamente 5×10^8 ufc/g, aproximadamente 1×10^9 ufc/g, aproximadamente 5×10^9 ufc/g, aproximadamente 1×10^{10} ufc/g, aproximadamente 5×10^{10} ufc/g, aproximadamente 1×10^{11} ufc/g, aproximadamente 5×10^{11} ufc/g de peso seco.

Pueden combinarse dos o más productos alimenticios fermentados preparados por los métodos de la invención antes de su administración. Por ejemplo, pueden combinarse productos de leche fermentados con productos de cereal fermentados. Como alternativa, el producto alimenticio fermentado puede combinarse con otros productos alimenticios, por ejemplo, productos alimenticios no fermentados o productos alimenticios fermentados usando otras cepas bacterianas. Puede usarse cualquier combinación con la condición de que se retengan los efectos sobre los péptidos de gliadina del alimento fermentado. Los productos alimenticios ejemplares incluyen, sin limitación, productos lácteos, por ejemplo, leche, yogur, cuajada, queso y productos basados en queso, leches fermentadas, productos fermentados basados en leche, polvos de base de leche, fórmulas infantiles, alimentos infantiles strained de base de leche, crema helada, helado, pudines, sopas, salsas, pures o aliños, fórmulas nutritivas para los ancianos; productos de cereal, por ejemplo, pabulum, alimentos infantiles colados de base de cereal, harina de avena, fécula, semolina, polenta, pasta, gallegas, galletas saladas, barritas energéticas; productos de hortalizas, por ejemplo, purés, alimentos infantiles colados de base de hortalizas, hortalizas encurtidas incluyendo pepinos, col,

zanahorias, judías, pimientos o aderezos; productos de frutas, por ejemplo, alimentos infantiles colados de base de frutas, productos de tomate, purés, salsas, pastas, ketchup, purés de frutas; o productos basados en proteína, por ejemplo, legumbres, salchichas, fiambres, perritos calientes o carnes en puré. En algunas realizaciones, el alimento fermentado puede combinarse con alimentos para mascotas o piensos para animales.

5

Composiciones farmacéuticas

Las composiciones descritas en este documento pueden combinarse con un vehículo farmacéuticamente aceptable. La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable", como se usa en este documento, incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos, isotónicos y retardadores de la absorción, tampones, excipientes, aglutinantes, lubricantes, geles, tensioactivos y similares, que pueden usarse como medio para una sustancia farmacéuticamente aceptable.

10

Por tanto, la invención también incluye composiciones farmacéuticas que contienen, como ingrediente activo, el uno o más metabolitos producidos por *L. paracasei* CBA L74 descritos en este documento, en combinación con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. En algunas realizaciones, la *L. paracasei* CBA L74 puede esterilizarse usando técnicas de esterilización convencionales antes o después de combinarse con el vehículo farmacéuticamente aceptable. En la preparación de las composiciones de la invención, el uno o más metabolitos producidos por *L. paracasei* CBA L74 se mezclan típicamente con un excipiente, se diluyen por un excipiente o se encierran dentro de dicho vehículo en forma de, por ejemplo, una cápsula, comprimido, sobrecito, envoltorio u otro recipiente. Cuando el excipiente sirve como diluyente, puede ser un material sólido, semisólido o líquido (por ejemplo, solución salina normal), que actúa como vehículo, transportador o medio para el ingrediente activo. Por tanto, las composiciones pueden estar en forma de comprimidos, píldoras, polvos, grageas, sobrecitos, obleas, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, aerosoles (como un sólido o en un medio líquido), pomadas, cápsulas blandas y duras de gelatina, supositorios, soluciones inyectables estériles y polvos envasados estériles. Como se sabe en la técnica, el tipo de diluyente puede variar dependiendo de la vía pretendida de administración. Las composiciones resultantes pueden incluir agentes adicionales, tales como conservantes. El excipiente o vehículo se selecciona basándose en el modo y vía de administración. Los vehículos farmacéuticos adecuados, así como las necesidades farmacéuticas para su uso en formulaciones farmacéuticas, se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences (E. W. Martin), un texto de referencia bien conocido en este campo, y en la USP/NF (Farmacopea de Estados Unidos y el Vademécum Nacional). Algunos ejemplos de excipientes adecuados incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábica, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabe y metilcelulosa. Las formulaciones pueden incluir adicionalmente: agentes lubricantes, tales como talco, estearato de magnesio y vaselina líquida; agentes humectantes; agentes emulsionantes y de suspensión; agentes conservantes tales como metil- y propilhidroxibenzoatos; agentes edulcorantes; y agentes aromatizantes. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse para proporcionar una liberación rápida, mantenida o retardada del ingrediente activo después de la administración al paciente empleando procedimientos conocidos en la técnica.

15

20

25

30

35

40

45

50

Las composiciones farmacéuticamente aceptables para su uso en los presente métodos, incluyendo aquellos en que se atrapan uno o más metabolitos producidos por *L. paracasei* CBA L74 en un coloide para suministro oral, pueden prepararse de acuerdo con técnicas convencionales. El uno o más metabolitos producidos por *L. paracasei* CBA L74 pueden secarse y compactarse por molienda o pulverización e insertarse en una cápsula para administración oral. En algunas realizaciones, el uno o más metabolitos producidos por *L. paracasei* CBA L74 pueden combinarse con uno o más excipientes, por ejemplo, un disgregante, un relleno, un emoliente o un conservante. Las cápsulas adecuadas incluyen tanto cápsulas de cubierta dura como cápsulas de cubierta blanda. Cualquier coloide basado en lípidos o basado en polímeros puede usarse para formar la cápsula. Los polímeros ejemplares útiles para preparaciones de coloides incluyen gelatina, polisacáridos vegetales u otros derivados tales como carrageninas y formas modificadas de almidón y celulosa, por ejemplo, hipromelosa. Opcionalmente, pueden añadirse otros ingredientes a la solución de agente gelificante, por ejemplo, plastificantes tales como glicerina y/o sorbitol para disminuir la dureza de la cápsula, agentes colorantes, conservantes, disgregantes, lubricantes y tratamiento superficial. En algunas realizaciones, la cápsula no incluye gelatina. En otras realizaciones, la cápsula no incluye polisacáridos vegetales o sus derivados.

55

60

65

Independientemente de su fuente original o la manera en que se obtienen, el uno o más metabolitos producidos por *L. paracasei* CBA L74 pueden formularse de acuerdo con su uso. Estas composiciones pueden prepararse de una manera bien conocida en la técnica farmacéutica, y pueden administrarse por una diversidad de vías, dependiendo de si se desea tratamiento local o sistémico y de la zona a tratar. La administración puede ser oral o tópica (incluyendo oftálmicas y a las membranas mucosas incluyendo suministro intranasal, vaginal y rectal). En algunas realizaciones, la administración puede ser pulmonar (por ejemplo, por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluyendo por nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica) u ocular. Los métodos para suministro ocular pueden incluir administración tópica (colirio), subconjuntival, periocular o inyección intravítrea o introducción por catéter de globo o piezas oftálmicas colocadas quirúrgicamente en el saco conjuntival. La administración parenteral incluye inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o administración intracraneal, por ejemplo, intratecal o intraventricular. La administración parenteral puede ser en forma de una única dosis en bolo, o puede ser, por ejemplo, por una bomba de perfusión continua. Las

composiciones farmacéuticas y formulaciones para administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, pulverizaciones, líquidos, polvos y similares. Pueden ser necesarios o deseables vehículos farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo u oleosas, espesantes y similares.

5 Las composiciones pueden formularse en una forma galénica unitaria, conteniendo cada dosificación, por ejemplo, de aproximadamente 0,005 mg a aproximadamente 2000 mg de *L. paracasei* CBA L74 o uno o más metabolitos producidos por *L. paracasei* CBA L74, por dosis diaria. La expresión "formas galénicas unitarias" se refiere a unidades físicamente concretas adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos u otros mamíferos, 10 conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con un excipiente farmacéutico adecuado. Para preparar composiciones sólidas tales como comprimidos, el ingrediente activo principal se mezcla con un excipiente farmacéutico para formar una composición de preformulación sólida que contiene una mezcla homogénea de un compuesto de la presente invención. Cuando se hace referencia a estas composiciones de preformulación como homogéneas, el ingrediente 15 activo típicamente se dispersa uniformemente en toda la composición de modo que la composición pueda subdividirse fácilmente en formas galénicas unitarias igual de eficaces tales como comprimidos, píldoras y cápsulas. Esta preformulación sólida entonces se subdivide en formas galénicas unitarias del tipo descrito anteriormente que contienen de, por ejemplo, 0,005 mg a aproximadamente 1000 mg de *L. paracasei* CBA L74 o uno o más metabolitos producidos por *L. paracasei* CBA L74 de la presente invención.

20 Las composiciones pueden formularse en una forma galénica unitaria, conteniendo cada dosificación, por ejemplo, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 50 mg, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 40 mg, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 20 mg, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 10 mg, 25 de aproximadamente 0,2 mg a aproximadamente 20 mg, de aproximadamente 0,3 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 0,4 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 1 mg; de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 100 mg, de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 50 mg, de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 30 mg, de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 20 mg, de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 5 mg; de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 50 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 30 mg., de 30 aproximadamente 1 mg a aproximadamente 20 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 5 mg; de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 50 mg, de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 20 mg, de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 10 mg; de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 100 mg, de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 200 mg, de aproximadamente 30 mg a aproximadamente 150 mg, de aproximadamente 40 mg a aproximadamente 100 mg, de 35 aproximadamente 50 mg a aproximadamente 100 mg del ingrediente activo.

En algunas realizaciones, los comprimidos o píldoras de la presente invención pueden recubrirse o prepararse de otro modo para proporcionar una forma galénica que produzca la ventaja de acción prolongada. Por ejemplo, el comprimido o píldora puede comprender un componente de dosificación interior y uno de dosificación exterior, 40 estando el último en forma de una envoltura sobre el primero. Los dos componentes pueden estar separados por una capa entérica que sirve para resistir la disgregación en el estómago y permitir que el componente interior pase intacto al duodeno o se retarde su liberación. Puede usarse una diversidad de materiales para dichas capas entéricas o recubrimientos, incluyendo dichos materiales varios ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con dichos materiales como gomalaca, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

45 Las formas líquidas en que las composiciones de la presente invención pueden incorporarse para su administración por vía oral o por inyección incluyen soluciones acuosas, adecuadamente jarabes aromatizados, suspensiones acuosas u oleosas y emulsiones aromatizadas con aceites comestibles tales como aceite de algodón, aceite de sésamo, aceite de coco o aceite de cacahuete, así como elixires y vehículos farmacéuticos similares.

50 La proporción o concentraciones de las composiciones de la invención en una composición farmacéutica puede variar dependiendo de varios factores incluyendo la dosificación, las características químicas (por ejemplo, hidrofobia) y la vía de administración. Por ejemplo, la *L. paracasei* CBA L74 o uno o más metabolitos producidos por *L. paracasei* CBA L74 de la invención pueden proporcionarse en una cápsula que contiene de aproximadamente 55 0,005 mg a aproximadamente 1000 mg para administración oral.

En algunas realizaciones, las composiciones pueden incluir fermentados de *L. paracasei* CBA L74, para los que todas o sustancialmente todas las células de *L. paracasei* CBA L74 se han eliminado. Los métodos para separar células del medio de crecimiento son bien conocidos en la técnica y pueden depender de métodos físicos, por 60 ejemplo, centrifugación para producir un sedimento celular y un sobrenadante de cultivo, filtración, ultrafiltración, filtración de flujo tangencial, filtración de flujo normal u ósmosis inversa. Como alternativa o adicionalmente, el método de separación puede estar basado en ligando e incluye, por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a *L. paracasei* CBA L74. El anticuerpo puede acoplarse a un soporte sólido tal como una microesfera magnética.

65

Las composiciones incluyen uno o más metabolitos de *L. paracasei* CBA L74, es decir, cualquier sustancia producida por *L. paracasei* CBA L74. El metabolito puede estar codificado por uno o más genes o puede generarse por la actividad enzimática de uno o más productos génicos. Los metabolitos incluyen, por ejemplo, moléculas pequeñas, por ejemplo, aminoácidos, nucleósidos, nucleótidos, así como estructuras poliméricas más grandes tales como polipéptidos, carbohidratos, ácidos nucleicos, proteoglucanos y lípidos. El metabolito puede ser un metabolito principal, por ejemplo, un metabolito implicado directamente en la función celular normal o un metabolito secundario, por ejemplo, un metabolito típicamente no necesario para las funciones celulares fundamentales. Un metabolito también puede incluir cualquier intermedio metabólico generado durante la síntesis de un metabolito principal o secundario. Los intermedios pueden incluir, aunque sin limitación, intermedios de las rutas de pentosa fosfato (pentosa-P) de Embden-Meyerhof, la ruta de Entner-Doudoroff, el ciclo de citrato y la biosíntesis de aminoácidos.

Los metabolitos principales ejemplares incluyen, sin limitación, alcoholes, por ejemplo, etanol, metanol, butanol; aminoácidos, por ejemplo, lisina, arginina, ornitina, histidina, citrulina, isoleucina, alanina, valina, leucina, glicina, treonina, serina, prolina, fenilalanina, tirosina, triptófano, cisteína, cistina, metionina, ácido glutámico, ácido aspártico; glutamina y asparagina; nucleótidos, por ejemplo, ácido 5' guanílico; antioxidantes, por ejemplo, ácido isoascórbico; ácidos orgánicos, por ejemplo, ácido acético, ácido láctico, ácido cítrico; vitaminas, por ejemplo, vitamina B12; azúcares, ácidos grasos.

Un metabolito también puede ser un metabolito secundario. Los metabolitos secundarios típicamente son aquellos que no son necesarios para las funciones celulares fundamentales. Los metabolitos secundarios pueden variar ampliamente; los metabolitos secundarios ejemplares incluyen antibióticos, hormonas, flavonoides, terpenoides, alcaloides, fenilpropanoides, derivados de fenilo, derivados de hexanol, cumarinas, estilbenos, cianohidrininas, glucosinolatos, esteroides y saponinas.

Los lactobacilos típicamente producen los siguientes metabolitos durante la fermentación de productos de leche: ácido láctico/lactato, acetato, etanol, formiato, acetaldehído, α -acetolactato, acetoína, diacetina y 2,3 butilenglicol (butanodiol) durante la fermentación de productos de leche. La fermentación puede ser cualquier proceso en que un microbio cause o contribuya a una descomposición de una sustancia orgánica compleja en sustancias más simples.

El metabolito de *L. paracasei* CBA L74 puede estar contenido dentro del medio, los fermentados o los sobrenadantes de cultivo. En algunas realizaciones el metabolito puede estar parcial o sustancialmente aislado del medio, los fermentados o sobrenadantes de cultivo. Los métodos para el aislamiento de metabolitos variarán de acuerdo con la estructura y química del metabolito particular. Un metabolito parcial o sustancialmente aislado retendrá la actividad funcional, es decir, la capacidad de conferir un efecto terapéutico a la descendencia cuando se administra a la madre en periodo de lactancia de la descendencia. Pueden usarse métodos convencionales conocidos en la técnica para el aislamiento y caracterización de metabolitos de *L. paracasei* CBA L74. Los métodos ejemplares incluyen, por ejemplo, análisis de estabilidad, por ejemplo, estabilidad al calor, pH y/o actividad enzimática; análisis cromatográfico, por ejemplo, cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC), cromatografía de gases, cromatografía en capa fina, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía en fase inversa; espectrometría de masas.

Usos

Las composiciones divulgadas en este documento son útiles en general y de forma variada para tratar infecciones microbianas en lactantes cuando se administran a las madres en periodo de lactancia de esos lactantes. Las composiciones pueden administrarse a la madre de forma prenatal, es decir antes de que nazca el lactante, o de forma posnatal, es decir, después de que haya nacido el lactante, o tanto de forma prenatal, es decir, antes de que nazca el lactante como de forma posnatal, es decir, después de que nazca el lactante. Los sujetos para los que dicho tratamiento es beneficioso incluyen lactantes normales, que han llegado a término, así como lactantes prematuros, pretérmino o de bajo peso al nacer.

Las composiciones pueden usarse en el tratamiento de infecciones en lactantes en lactancia de cualquier edad, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 30 días de edad; o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses de edad; o 1, 2, 3 o aproximadamente 4 años de edad o hasta que el lactante se haya destetado. Las composiciones son aplicables tanto a infecciones congénitas, es decir, infecciones adquiridas en el útero, como infecciones neonatales, es decir infecciones adquiridas en o poco después del nacimiento. Una infección microbiana puede incluir una infección causada por una bacteria, virus, protozoo u hongo. Las infecciones congénitas típicamente son el resultado de la transmisión a través de la placenta y se presentan de forma prenatal, intranatal o inmediatamente después del parto. Los agentes infecciosos congénitos comunes incluyen *Viridans streptococci* y *S. agalactiae*. Las infecciones neonatales en general se adquieren como infecciones ascendentes de la vía del parto, o mediante el entorno externo o a través de la leche materna. Dichas infecciones se presentan durante el periodo posparto, por ejemplo, en aproximadamente un mes desde el nacimiento. Los agentes infecciosos neonatales comunes incluyen, por ejemplo, *Viridans streptococci*, *S. agalactiae* y otros estreptococos del grupo B, *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Yersinia*, *Shigella*, *Clostridium* y *Helicobacter pylori*. En algunas realizaciones, el agente infeccioso puede ser un virus, por ejemplo, rotavirus,

rubeola, citomegalovirus o un herpesvirus. En algunas realizaciones, el agente infeccioso puede ser un protozoo, por ejemplo, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium* spp, *Campylobacter* spp. o *Toxoplasma* spp. En algunas realizaciones, el agente infeccioso puede ser un hongo, por ejemplo, *Candida* spp., por ejemplo, *C. albicans* o *C. parapsilosis*, o *Malassezia*, *Zygomycetes*, o *Aspergillus*.

5 Un sujeto, por ejemplo, un descendiente de una madre en periodo de lactancia que recibe un producto alimenticio o composición farmacéutica descrita en este documento, se trata de forma eficaz siempre que se asegure un resultado clínicamente beneficioso. Esto puede significar, por ejemplo, una resolución completa de los síntomas asociados con una infección, una disminución en la gravedad de los síntomas asociados con una infección o una ralentización de la
10 progresión de los síntomas asociados con una infección. Estos métodos pueden incluir además las etapas de a) identificar a un sujeto (por ejemplo, un paciente y, más específicamente, un paciente humano) que tiene una infección; y b) proporcionar a la madre en periodo de lactancia del paciente una composición descrita en este documento, tal como cualquier producto alimenticio fermentado o composición en un vehículo fisiológicamente aceptable. Una cantidad de dicha composición proporcionada a la madre en periodo de lactancia que provoca una
15 resolución completa de los síntomas del lactante asociados con una infección, una disminución en la gravedad de los síntomas asociados con una infección o una ralentización de la progresión de los síntomas asociados con una infección se considera una cantidad terapéuticamente eficaz. Los presentes métodos también pueden incluir una etapa de control para ayudar a optimizar la dosis y posología, así como el resultado predicho.

20 Las composiciones divulgadas en este documento pueden aplicarse a una amplia gama de especies, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos (por ejemplo, monos), caballos, cerdos, vacas u otro tipo de ganado, perros, gatos u otros mamíferos mantenidos como mascotas, ratas, ratones u otros animales de laboratorio. Las composiciones descritas en este documento son útiles en composiciones y regímenes terapéuticos o para la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento de afecciones como se describe en este documento
25 (por ejemplo, una infección neonatal o congénita).

Las composiciones nutritivas descritas en este documento pueden administrarse por vía oral como parte de una dieta diaria habitual de la gestante o madre en periodo de lactancia. Cuando se formulan como agentes farmacéuticos, las composiciones pueden administrarse a cualquier parte del organismo del hospedador para
30 posterior suministro a una célula diana. Una composición puede suministrarse a, sin limitación, el cerebro, el líquido cefalorraquídeo, las articulaciones, la mucosa nasal, la sangre, los pulmones, los intestinos, tejidos musculares, la piel o la cavidad peritoneal de un mamífero. En términos de vías de suministro, una composición puede administrarse por vía intravenosa, intracraneal, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intramuscular, intrarrectal, intravaginal, intratecal, intratraqueal, intradérmica o por inyección transdérmica, por administración oral o nasal o por perfusión gradual a lo largo del tiempo. En un ejemplo adicional, puede darse una preparación en aerosol de una
35 composición a un hospedador por inhalación.

Independientemente de si las composiciones se formulan como productos alimenticios o como agentes farmacéuticos, la dosificación requerida dependerá de la vía de administración, la naturaleza de la formulación, el
40 tamaño de la madre, el peso, el área superficial, la edad y sexo, otros fármacos que se estén administrando y el criterio de los médicos a cargo. Las dosificaciones adecuadas están en el intervalo de 0,01-1000 mg/kg. Algunos intervalos de dosis típicos son de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 1 g/kg de peso corporal por día. En algunas realizaciones, el intervalo de dosis es de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por día. En algunas realizaciones, la dosis puede ser, por ejemplo, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 5 mg/kg,
45 10 mg/kg, 20 mg/kg, 50 mg/kg o 100 mg/kg. La dosificación probablemente depende de variables tales como el tipo y grado de progresión de la enfermedad o trastorno, el estado de salud global del paciente particular, la eficacia biológica relativa del compuesto seleccionado, la formulación de excipiente y su vía de administración.

Las dosis eficaces pueden extrapolarse de curvas de dosis y respuesta derivadas de sistemas de ensayo *in vitro* o
50 en modelo animal. Por ejemplo, el análisis *in vitro* del funcionamiento del sistema inmunológico, por ejemplo, producción de citocinas por células mononucleares de sangre periférica (PBMC), puede ser útil para evaluar respuestas pro- y antiinflamatorias, por ejemplo, secreción de IL-1β, IL-12, IL-4, TNF-α o IL-10, respectivamente. Las composiciones también pueden analizarse para sus efectos en modelos animales, por ejemplo, tasas de supervivencia en sistemas de infección modelo, por ejemplo, con *C. sakazakii* o *S. typhimurium* u otros indicadores
55 de funcionamiento del sistema inmunológico, por ejemplo, producción de IgA, producción de citocinas por explantes de placas de Peyer y respuestas de células dendríticas y linfocitos T.

Tienen que esperarse amplias variaciones en la dosificación necesaria en vista de la diversidad de dianas celulares o las diferentes eficacias de diversas vías de administración. Las variaciones en estos niveles de dosificación
60 pueden ajustarse usando rutinas empíricas convencionales para la optimización, que están bien comprendidas en la técnica. Las administraciones pueden ser únicas o múltiples (por ejemplo, 2 o 3, 4, 6, 8, 10, 20, 50, 100 150 o más veces). La encapsulación de los compuestos en un vehículo de suministro adecuado (por ejemplo, micropartículas poliméricas o dispositivos implantables) puede aumentar la eficacia de suministro.

65 La duración del tratamiento con cualquier composición proporcionada en este documento también puede variar. La administración de las composiciones puede empezar durante la gestación y continuar después del nacimiento hasta

que se desteta a la descendencia. Como alternativa, la administración puede interrumpirse después del nacimiento o la administración puede empezar cualquier momento después del nacimiento de la descendencia y continuar hasta que se destete a la descendencia. También debe apreciarse que la frecuencia de tratamiento puede ser variable. Por ejemplo, las presentes composiciones pueden administrarse una vez (o dos veces, tres veces, etc.) diariamente, semanalmente, mensualmente. Cuando las composiciones se formulan como producto alimenticio, por ejemplo, las composiciones pueden administrarse diariamente en todas las comidas.

Cualquier método conocido para los expertos en la materia puede usarse para determinar si se induce una respuesta particular. Los métodos clínicos que pueden evaluar el grado de una patología particular pueden usarse para determinar si se induce una respuesta. Por ejemplo, puede controlarse el alivio sintomático de un sujeto, por ejemplo, el alivio de fiebre, cólico, diarrea, náuseas, vómitos, convulsiones, ictericia, bajo nivel de azúcar en la sangre, además del control por ensayos clínicos, por ejemplo, cultivo de microorganismos, recuentos sanguíneos, cribado de líquido cefalorraquídeo, marcadores de suero, técnicas de imágenes, por ejemplo, métodos de ultrasonidos, rayos X y endoscópicos.

Las composiciones también pueden administrarse junto con otras modalidades terapéuticas. En algunas realizaciones, la descendencia puede tratarse con agentes convencionales, por ejemplo, antibióticos, agentes antiinflamatorios, antihistamínicos y otros tratamientos alimenticios, por ejemplo, formulas infantiles hipoalergénicas. La administración simultánea de dos o más agentes terapéuticos no requiere que los agentes se administren al mismo tiempo o por la misma vía, siempre que haya un solapamiento en el periodo de tiempo durante el que los agentes están ejerciendo su efecto terapéutico. Se contempla la administración simultánea o secuencial, así como la administración en diferencias días o semanas.

Se pretende que esta descripción de realizaciones preferidas se lea en relación con los dibujos adjuntos, que tienen que considerarse parte de la descripción escrita completa de esta invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Materiales y métodos

Preparación de leche fermentada por *L. paracasei* CBA L74:

- Sustrato: Leche en polvo desnatada reconstituida al 9 %, dextrosa añadida al 0,25 %
- Tratamiento térmico del sustrato: UHT - 135 °C durante 3 s o equivalente F_0
- Coinóculo: 5×10^6 para *Lactobacillus paracasei* CBA-L74 5×10^4 para *Streptococcus thermophilus* (como iniciador de la fermentación)
- Temperatura de fermentación: 37 °C
- Tiempo de fermentación: 15 horas
- pH durante la fermentación: Sin ajuste
- Al final de la fermentación, ajuste del pH a 6,5 con solución de NaOH
- Secado por pulverización con temperatura de entrada de 190 °C y temperatura de salida de 90 °C
- Análisis: Recuento de células en el fermentado para determinar *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus paracasei* CBA L74

Siembra en placa: Se usó agar selectivo de lactobacilos (LBS) para la detección de *Lactobacillus paracasei* CBA L74. Se usó agar L-M17 para recuentos de *Streptococcus thermophilus*. Ambos se incubaron a 37 °C de forma anaerobia. Se usó agar de recuento de placas (PCA) para la detección de contaminantes y se incubó a 30 °C de forma aerobia.

Fermentación: Se añadió coinóculo de *L. paracasei* CBA L74 y *S. thermophilus* 1773 como cultivos frescos. La fermentación se realizó durante 15 horas, hasta una concentración de 10^8 ufc/ml de *L. paracasei* CBA L74. El pH inicial fue 6,6. Al final de la fermentación el pH era 5,1. El pH se ajustó a 6,5 añadiendo NaOH 2,5 N. La concentración inicial de *L. paracasei* CBA L74 fue 5×10^6 UFC/ml; la concentración final era de más de 10^8 UFC/ml. La concentración inicial de *Streptococcus thermophilus* era de 5×10^4 UFC/ml; la concentración era de 1×10^8 UFC/ml. El recuento de bacterias totales inicial en PCA fue 0 en la leche antes de la inoculación y en T0 y demasiado pocas colonias para el recuento (TFTC) después del periodo de fermentación de 15 horas fue 5×10^4 UFC/ml; la concentración final fue 1×10^8 UFC/ml.

Secado: El fermentado se secó a una temperatura de entrada de 190 °C y una temperatura de salida de 90 °C. El contenido de humedad del polvo después del secado por pulverización fue de un 4,87 %.

Preparación de arroz fermentado con *L. paracasei* CBA L74: Se preparó una solución de un litro de un 15 % en peso/volumen de arroz combinando 150 g de arroz y 900 ml de agua. La mezcla se preparó a temperatura ambiente y se mezcló por agitación durante varios minutos a 1000-1300 r.p.m. La mezcla de arroz se trató por tindalización calentando la mezcla dentro del instrumento a 70 °C, privación a 70 °C durante 20-30 minutos, refrigeración a

30-37 °C, privación a 30-37 °C durante 20-30 minutos, calentamiento a 70 °C, privación a 70 °C durante 20-30 minutos, refrigeración a la temperatura de fermentación (37 °C) mientras se agitaba a 150-160 r.p.m.

Se añadió *L. paracasei* CBA L74 de una muestra liofilizada hasta una concentración final de 1×10^6 UFC/ml. La muestra liofilizada se resuspendió en agua y se incubó brevemente a 37 °C para activar las bacterias. Después de la inoculación, la mezcla se homogeneizó por agitación brevemente a 300-600 r.p.m.; durante la fermentación, la solución se agitó a 150 r.p.m. La fermentación se realizó a 37 °C durante 24 horas a una pO₂ de <15 %. Se recogieron alícuotas en el momento de la inoculación (T0), a las 16 horas (T16), 18 horas (T18), 21 horas (T21) y a las 24 horas (T24). Después de la fermentación, el cereal se calentó hasta 50 °C con mezcla continua. El cereal calentado entonces se secó por pulverización a T aire_{entr.} 80 °C, T aire_{sal.} 210 °C. El contenido de humedad final fue de un 6 %.

Las muestras se analizaron en agar de Rogosa (+ 12 µg/ml de vancomicina) (48 h a 37 °C), para la cuantificación de *L. paracasei* CBA L74, en PCA para los anaerobios totales (24 h a 37 °C), en agar de McConkay para coliformes y agar RCM para *Clostridia*.

Los resultados de esta fermentación fueron los siguientes:

Inóculo (*L. paracasei* CBA-174): 1×10^6 (+/- ½ log) UFC/ml (en el instrumento)
 Concentración de *L. paracasei* CBA L74 después de 24 horas de fermentación: 1×10^8 (+/-½ log) UFC/ml
 Contaminantes en PCA antes del inóculo: < 10⁴ UFC/ml
 Contaminantes en McConkay antes del inóculo: < 10⁴ UFC/ml
 Contaminantes en RCM antes del inóculo: < 10 UFC/ml
 Contaminantes en PCA después del inóculo: < 10⁴ UFC/ml
 Contaminantes en PCA después de 24 horas de fermentación: < 10⁴ UFC/ml
 pH antes de la adición del inóculo: 6 (+/- 0,20)
 pH a las 16-18 horas: 3,70 (+/-0,20)
 pH a las 24 horas: 3,60 (+/-0,20).

Ejemplo 2: Efecto de la administración materna de arroz fermentado con *L. paracasei* CBA L74 sobre la supervivencia de descendencia infectada con *C. Sakazakii*

Se preparó arroz fermentado con *L. paracasei* CBA L74 como se describe en el ejemplo 1. Se mezcló concentrado convencional de ratón (Mucedola, SLR, 4RF21 GLP Certificate) con arroz fermentado con *L. paracasei* CBA L74 o arroz no fermentado de modo que el arroz constituía un 10 % de la dieta diaria total de los ratones. Esta cantidad se diseñó para que imitara la cantidad diaria de *L. paracasei* CBA L74 que un lactante recibiría si se administrara arroz fermentado directamente al lactante. Las ratonas CD1 gestantes recibieron concentrado que contenía arroz fermentado con *L. paracasei* CBA L74 o arroz no fermentado empezando en el 14.º día de gestación hasta el suministro en el 21.º día de gestación y durante el periodo de lactancia.

Se realizó infección bacteriana de las crías con *C. Sakazakii* de la siguiente manera. Se cultivó *C. Sakazakii* cepa N13 en caldo M17 hasta DO 600≈0,6 y se resuspendió en tampón carbonato (5 % en agua) a una concentración de 10¹⁰ UFC/100 µl. Se sembraron diluciones en serie en agar LB para verificar la concentración del inóculo.

A las crías se les dosificó 100 µl de solución bacteriana (es decir, 10¹⁰ UFC) administrada mediante sonda oral en el día posnatal 3. Las crías se evaluaron diariamente para la supervivencia y los resultados se presentaron como la curva de supervivencia de Kaplan-Meier. Los resultados de este experimento se muestran en la figura 1 y la figura 2. Como se muestra en la figura 2, un porcentaje mayor de las crías de madres que recibieron arroz fermentado con *L. paracasei* CBA L74 durante la gestación y el periodo de lactancia ("E (RF)) (barras rellenas) sobrevivieron a infección de *C. sakazakii* en comparación con aquellas crías cuyas madres recibieron arroz no fermentado ("D(RNF)) (barras negras).

Ejemplo 3: Efecto de la administración materna de leche fermentada con *L. paracasei* CBA L74 sobre la supervivencia de descendencia infectada con *S. Typhimurium* FB62

Se preparó leche fermentada con *L. paracasei* CBA L74 como se describe en el ejemplo 1. Se mezcló concentrado convencional de ratón (Mucedola, SLR, 4RF21 GLP Certificate) con leche fermentada con *L. paracasei* CBA L74 o leche no fermentada de modo que la leche constituía un 5 % de la dieta diaria total de los ratones. Esta cantidad se diseñó para que imitara la cantidad diaria de *L. paracasei* CBA L74 que un lactante recibiría si se administrara leche fermentada directamente al lactante. Las ratonas CD1 gestantes recibieron concentrado que contenía leche fermentada con *L. paracasei* CBA L74 o leche no fermentada empezando en el 14.º día de gestación hasta el suministro en el 21.º día de gestación y durante el periodo de lactancia.

Se realizó infección bacteriana de las crías con *S. typhimurium* FB62 de la siguiente manera. Se cultivó *S. typhimurium* FB62 en LB hasta DO₆₀₀≈0,6 y se resuspendió en tampón carbonato (5 % en agua) a una

concentración de 10^8 UFC/100 μ l. Se sembraron diluciones en serie en agar LB para verificar la concentración del inóculo.

5 A las crías se les dosificó 100 μ l de solución bacteriana administrada mediante sonda oral en el posnatal 15. Las crías se evaluaron diariamente para la supervivencia y los resultados se presentaron como la curva de supervivencia de Kaplan-Meier. Los resultados de este experimento se muestran en la figura 3. Como se muestra en la figura 3, un mayor porcentaje de las crías de madres que recibieron leche fermentada con *L. paracasei* CBA L74 durante la gestación y el periodo de lactancia ("C (LF)") sobrevivieron a infección por *S. typhimurium* FB62 en comparación con aquellas crías cuyas madres recibieron leche no fermentada ("B(LNF)").

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un producto alimenticio fermentado para su uso en el tratamiento de una infección microbiana en un lactante de una gestante o una madre en periodo de lactancia, en el que el producto alimenticio se ha fermentado por la bacteria probiótica *Lactobacillus paracasei* CBA L74, número de acceso al Depósito Internacional LMG P-24778, en el que se administra una cantidad eficaz de producto alimenticio fermentado a la madre, el producto alimenticio fermentado comprende células de *Lactobacillus paracasei* CBA L74 y las células de *Lactobacillus paracasei* CBA L74 son no replicantes.
- 10 2. El producto alimenticio fermentado para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el producto alimenticio fermentado se administra de forma prenatal.
- 15 3. El producto alimenticio fermentado para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el producto alimenticio fermentado se administra de forma posnatal.
- 20 4. El producto alimenticio fermentado para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el producto alimenticio fermentado se administra de forma prenatal y posnatal.
- 25 5. El producto alimenticio fermentado para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el microbio es *Salmonella typhimurium*, *Cronobacter sakazakii*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, o un rotavirus.
- 30 6. El producto alimenticio fermentado para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el microbio es *Salmonella typhimurium* FB62 o *Cronobacter sakazakii*.
- 35 7. El producto alimenticio fermentado para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el producto alimenticio es un producto lácteo o un producto de cereal.
- 40 8. El producto alimenticio fermentado para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el producto alimenticio fermentado se administra hasta que mejora un síntoma de la infección.
- 45 9. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de una infección microbiana en un lactante de una gestante o madre en periodo de lactancia, comprendiendo la composición farmacéutica uno o más metabolitos producidos por *L. paracasei* CBA L74, número de acceso al Depósito Internacional LMG-P24778, en combinación con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, en la que se administra una cantidad eficaz de la composición farmacéutica a la madre.
- 50 10. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que la composición se administra de forma prenatal.
11. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que la composición se administra de forma posnatal.
12. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que la composición se administra de forma prenatal y posnatal.
13. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que la composición se formula en forma galénica unitaria conteniendo cada dosificación de 0,005 mg a 2000 mg de uno o más metabolitos producidos por *L. paracasei* CBA L74 por dosis diaria.

mPL11a: infección por *C. sakazakii*
Crías PND3, 10^{10} UFC/cría

Proporciones de supervivencia: arroz

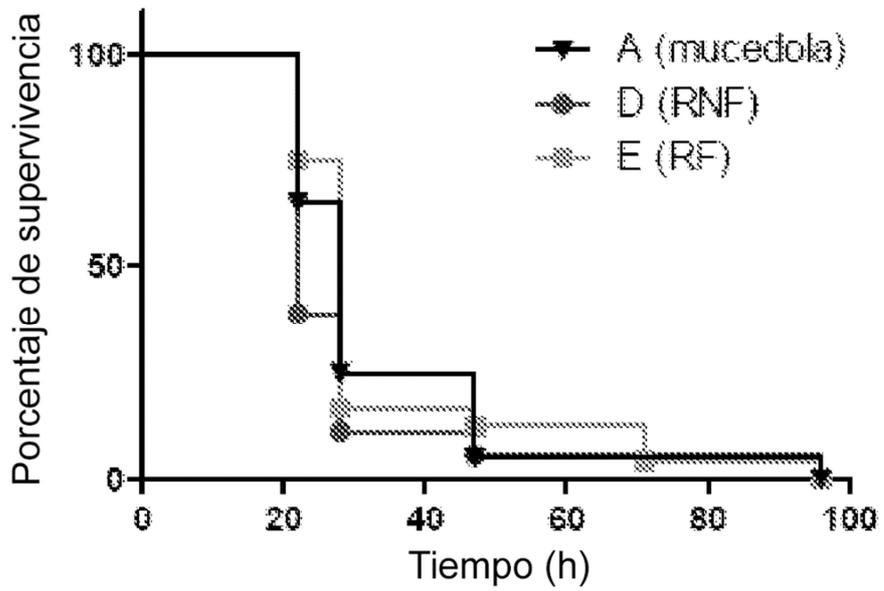
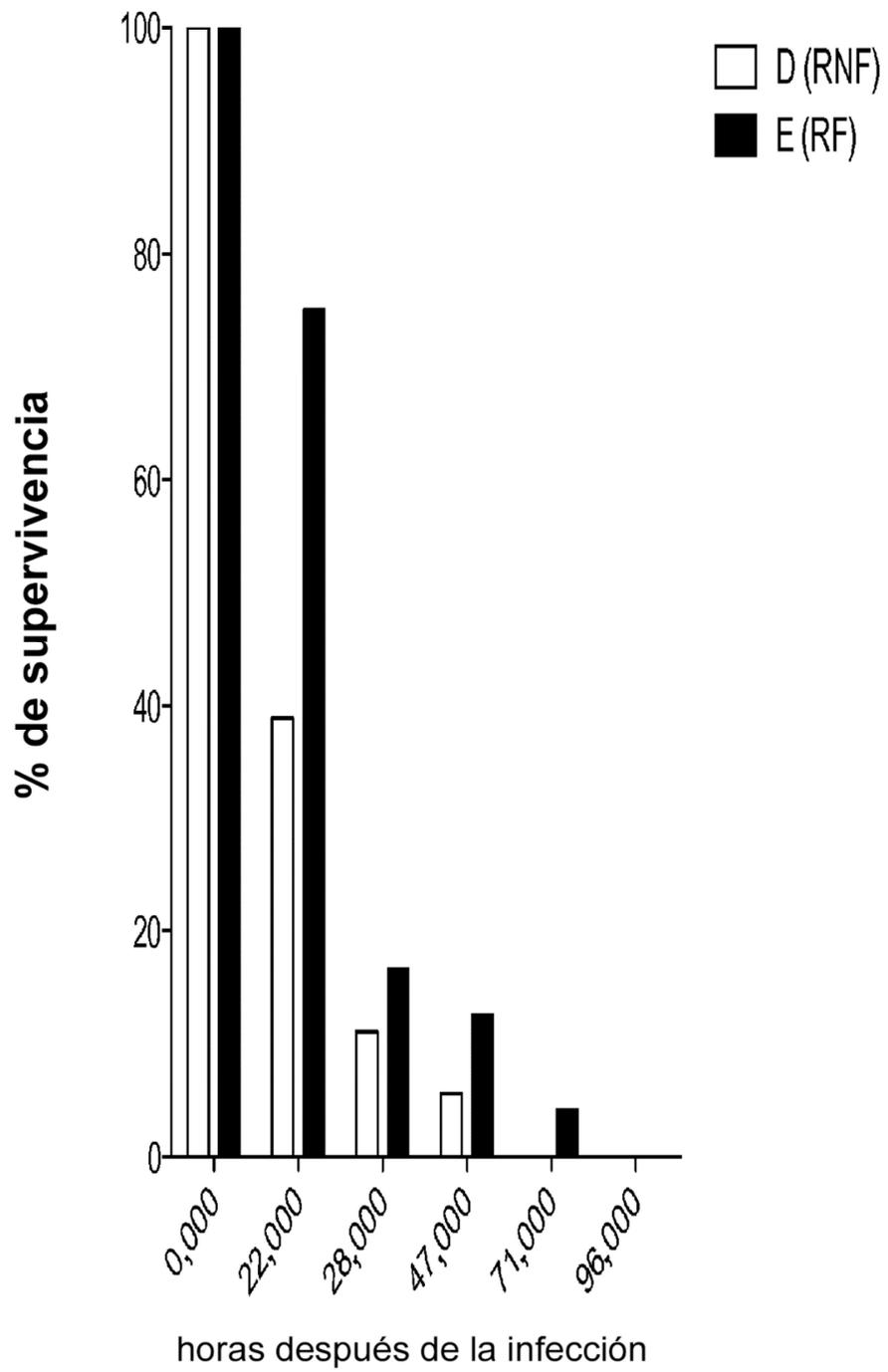


FIGURA 1

Supervivencia de arroz: proporciones de supervivencia

FIGURA 2



Proporciones de supervivencia:

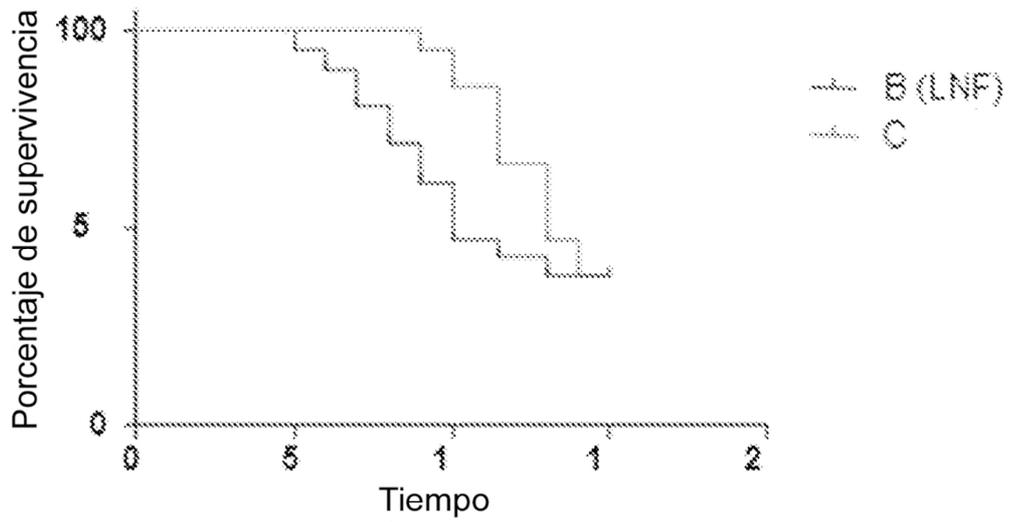


FIGURA 3